Rev. Acad. Canar. Cienc., XIII (Núm. 4), 253-261 (2001) (publicado en Julio de 2002)

EFECTO DE METALES TÓXICOS SOBRE DIFERENTES ESTIRPES DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BRADYRHIZOBIUM*

J. Hernández Hernández[1], W. Draghi[2] y J. Corzo[1]

[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Laguna. 38206 Tenerife, España

[2] Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires Av. República de Italia 780. C.C. 47 (7300). Azul. Argentina

ABSTRACT

The sensitivity to Cu^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Th^{4+} and Al^{3+} has been evaluated for a group of 13 bacterial strains belonging to the *Bradyrhizobium* genus of symbiotic bacteria. Bacteria were isolated from root nodules of *Adenocarpus, Chamaecytisus, Glycine, Lotus, Teline* and *Ulex*. There was not any relationship among the bacterial sensitivity to the metals and the geographical origin or with the host from which the bacteria were isolated. However, strain AU02I, isolated from *Ulex* nodules growing in the pyrite mines of Rio Tinto (Huelva, Spain) was the most insensitive to the toxic metals employed. In some strains Hg^{2+} increased the toxic effect of Cu^{2+}. This effect did not required direct contact between both metals.

RESUMEN

Se ha estudiado la sensibilidad a Cu^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Th^{4+} y Al^{3+} de un grupo de 13 estirpes de bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* aisladas de diferentes leguminosas. No se ha encontrado relación entre la resistencia a metales y el origen geográfico o la planta hospedadora de la que se aislaron las estirpes estudiadas, aunque la estirpe AU02I, aislada de nódulos de Ulex encontrada en el entorno de las minas de pirita de Río Tinto (Huelva), fue especialmente resistente a los metales estudiados. Se encontró que el Hg^{2+} incrementa la sensibilidad al Cu^{2+} de algunas estirpes. Este fenómeno no requirió el contacto directo entre ambos metales y se produjo entre estirpes diferentes.

Key words: Toxic metals, Bacterial resistance, *Bradyrhizobium*

Palabras clave: Metales tóxicos, resistencia bacteriana, *Bradyrhizobium.*

1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias de los géneros *Rhizobium, Bradyrhizobium* y relacionados son constituyentes frecuentes de la microbiota del suelo, pero destacan principalmente por su capacidad de infectar leguminosas formando nódulos radicales en donde llevan a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico hasta formas directamente asimilables por la planta hospe-

dadora [2]. Estas bacterias son importantes para el balance nitrogenado de los suelos, no sólo en ecosistemas naturales, en donde se ha encontrado una notable biodiversidad (por ejemplo, en el pinar de la Isla de Tenerife, [9]), sino también como inoculantes comerciales para establecer simbiosis con leguminosas de interés agrícola, en donde permiten prescindir del uso de fertilizantes nitrogenados. En el caso del género *Bradyrhizobium,* la soja es el cultivo más importante en el que se emplean estas bacterias.

Los metales pesados ejercen un importante efecto tóxico sobre las comunidades microbianas del suelo y el agua [5]. Esta toxicidad se ejerce bloqueando grupos funcionales esenciales, desplazando iones metálicos o alterando la conformación activa de macromoléculas específicas. La rápida industrialización a escala global implica que la liberación de origen antrópico de metales pesados al medio ambiente ha adquirido una relevante importancia, tanto en zonas previamente industrializadas como en zonas agrícolas. A pesar de su trascendencia, el efecto de estos metales tóxicos sobre los rizobios se ha estudiado en relativamente pocos casos, centrados por otra parte en bacterias del género *Rhizobium* [6, 11]. Por ello ha parecido interesante estudiar la resistencia a varios metales de una serie de estirpes bacterianas adscritas al género *Bradyrhizobium*, de distinto origen geográfico y aisladas de diferentes plantas hospedadoras, con el objeto de obtener una visión panorámica de la resistencia a metales entre las bacterias de este género.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estirpes empleadas y medios de cultivo.

Se usaron estirpes de bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* aisladas de nódulos de diferentes leguminosas (Tabla I).

Estirpe	Hospedador Original	Localidad
B. (Chamaecytisus) BCO-4	*Adenocarpus foliolosus*	Las Raíces (Tenerife)
B. (Chamaecytisus) BGA-1	*Teline stenopetala*	Mazo (La Palma)
B. (Chamaecytisus) BTA-1	*Chamaecytisus proliferus ssp. proliferus*	La Laguna (Tenerife)
B. (Chamaecytisus) BTA-7	*Chamaecytisus proliferus ssp. proliferus*	Garafía (La Palma)
B. (Chamaecytisus) BTA-8	*Chamaecytisus proliferus ssp. proliferus*	Fuencaliente (La Palma)
B. (Lotus) IB3	*Lotus subbiflorus*	Durazno (Uruguay)
B. (Lotus) IB4	*Lotus subbiflorus*	Durazno (Uruguay)
B. (Lotus) LS71	*Lotus subbiflorus*	Florida (Uruguay)
B. (Ulex) AU02I	*Ulex parviflorus*	Río Tinto (Huelva)
B. (Ulex) AU03	*Ulex parviflorus*	Río Tinto (Huelva)
B. (Ulex) AU02C	*Ulex parviflorus*	Río Tinto (Huelva)
B. japonicum E109	*Glycine max*	Nueva Zelanda[1]
B. japonicum E110	*Glycine max*	Brasil [1]
B. japonicum SEMIA 5080	*Glycine max*	Brasil [1]
B. japonicum USDA 110	*Glycine max*	EEUU [2]

[1] Suministradas por Ing. Agr. Alejandro Perticari. Área Microorganismos del Suelo - CNIA - INTA Castelar.
[2] Suministrada por el Dr. Ramón Bellogín. Universidad de Sevilla

Tabla I. Lista de las estirpes de Bradyrhizobium usadas en este trabajo.

En primer lugar se usaron 4 estirpes de interés agrícola, adscritas a la especie *B. japonicum*, siendo algunas de ellas empleadas como inoculantes comerciales para el cultivo de soja en Brasil y Argentina [10]. Las restantes estirpes empleadas se han aislado de nódulos de leguminosas silvestres. Cinco provienen de leguminosas arbustivas endémicas de Canarias, caracterizadas previamente en nuestro laboratorio [8]. Tres estirpes, aisladas en nuestro laboratorio, provienen de nódulos de *Ulex parviflorus* del nacimiento del Río Tinto, en la zonas de minería de pirita de dicha localidad de la provincia de Huelva, y otras 3 estirpes fueron aisladas en Uruguay a partir de nódulos de *Lotus subbiflorus* [4]. Todos los aislados presentaron patrones electroforéticos de sus lipopolisacáridos claramente diferenciables, por lo que pueden considerarse estirpes diferentes [7].

Las bacterias se cultivaron en medio líquido YM, compuesto por K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4$ 0,02%, NaCl 0,01%, extracto de levadura 0,08% en agua. En el medio original de Vincent [12] se empleaba como fuente de carbono manitol a una concentración de 10 g/l; para evitar la excesiva producción de polisacáridos la concentración de manitol empleada en este trabajo ha sido de 1 g/l . El pH del medio se ajustó a 6,5. Para el cultivo en placa se añadió al medio agar al 2% y Rojo Congo a una concentración de 25 mg/l.

2.2 Determinación de la resistencia relativa a metales.

Se determinó el efecto de las siguientes sales metálicas: $CuSO_4.5H_2O$; $HgCl_2$; $Cd(NO_3)_2.4H_2O$; $Th(NO_3)_4.4H_2O$; $Pb(NO_3)_2$ y $AlCl_3$. Se decidió emplear un método basado en la difusión del metal en medio de cultivo sólido. A pesar de que este método no permite conocer con precisión la concentración real del metal que está actuando sobre la bacteria debido al desconocimiento de la constante de difusión del catión metálico en el medio de cultivo [3], sí que es posible realizar con facilidad el estudio comparado de una gran cantidad de muestras y determinar la toxicidad relativa del metal para los diferentes aislados [3]. En resumen, el método consiste en determinar el diámetro del halo de inhibición producido por diferentes concentraciones de metal sobre el crecimiento de un césped bacteriano homogéneo. Para ello se procedió del siguiente modo:

El crecimiento bacteriano en medio líquido se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm. Para los ensayos se ajustó con agua estéril a un valor comprendido entre 0,8 y 1,1 unidades; seguidamente 500 µl de la suspensión bacteriana se extendieron homogéneamente sobre medio YM en placa de Petri y se dejó secar al aire. Posteriormente se depositaron 5 µl de la disolución del metal a la concentración correspondiente a cada experimento, y se dejó secar al aire. Las placas se incubaron a 30° y se midió periódicamente el diámetro del halo de inhibición hasta los 7 días de cultivo. La aplicación presentó un diámetro comprendido entre 5 y 6 mm.

Sin embargo, para metales que formen complejos insolubles con alguno de los componentes del medio de cultivo este método no es aplicable. Esto se debe a que si no difunde el metal libremente no se originarían gradientes de concentración de la especie metálica a partir del punto de aplicación de la disolución del metal y, por consiguiente, no se formarán halos de inhibición.

La primera parte de este estudio se centra en determinar cuales son los cationes metálicos cuya toxicidad relativa puede ser evaluada por el método de difusión en el medio sólido complejo empleado, comparando los resultados obtenidos con un ensayo de toxicidad del metal en medio líquido. Para ello se cultivó la estirpe seleccionada en medio YM, al que se le añadió el metal a la concentración adecuada. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la absorbancia de la disolución a distintos tiempos de cultivo.

3 RESULTADOS

3.1 Aplicabilidad del método empleado para el estudio de la toxicidad de metales.

En experimentos previos se encontró que ni el agua destilada ni disoluciones hasta 100 mM de KNO_3 produjeron halos de inhibición en el crecimiento de los céspedes bacterianos.

Para determinar la aplicabilidad del método de difusión radial en agar se emplearon las estirpes USDA110, BTA-1 y BGA-1. En estos casos se obtuvieron halos de inhibición del crecimiento claros y definidos con Hg^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} y Cd^{2+} a concentración 10 mM para el mercurio, o 100 mM para los restantes metales. Sin embargo, no se encontró ningún halo de inhibición con Th^{4+} incluso a una concentración de 100 mM. En este caso se formó un precipitado en el punto de aplicación de la disolución del metal. La carencia de halo de inhibición no se debe a falta de toxicidad del torio, ya que el Th^{4+} inhibe el crecimiento de *Bradyrhizobium* BGA-1 en medio líquido a concentraciones muy inferiores a 1 mM (Figura 1). En estas condiciones se formó un precipitado a concentraciones de torio superiores a 100 µM; sin embargo, se pudo observar la inhibición del crecimiento a concentraciones de 200 y 500 µM.

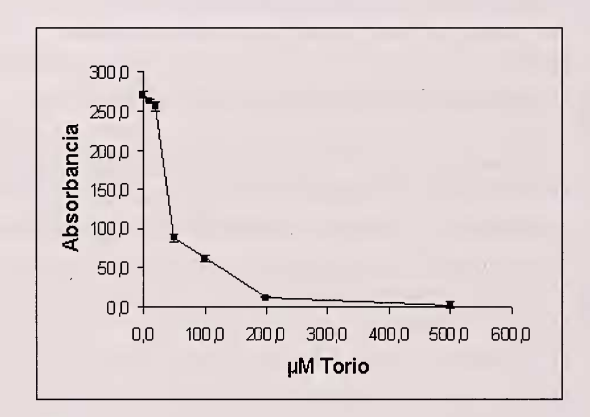


Figura 1. Absorbancia de cultivos de 7 días B. (Chamaecytisus) BGA-1 crecidos en medio líquido YM con diferentes concentraciones de torio añadidas al inicio del cultivo.

El comportamiento del Pb^{2+} en medio sólido fue parecido. Aunque a una concentración de 100 mM se produce un pequeño halo de inhibición, este fue sólo 2 ó 3 mm mayor que al diámetro de la aplicación, apareciendo además un precipitado en dicho punto. Además, no fue posible medir su posible efecto tóxico en medio líquido YM porque formó un precipitado con el medio y no originó inhibición del crecimiento hasta una concentración 10 mM.

3.2 Efecto del tamaño del inóculo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Para comprobar si el número de bacterias empleadas como inóculo para la siembra del césped tenía alguna influencia sobre el halo de inhibición causado por el metal se empleó Hg^{2+} y las estirpes BCO-4 y AU02I, que por experimentos previos se sabía que eran sensible y resistente, respectivamente, al mercurio. Los resultados se muestran en la tabla II.

	BCO-4 (Hg^{2+} 1 mM)			AU02I (Hg^{2+} 10 mM)		
Dilución del inóculo	1/1	1/10	1/100	1/1	1/10	1/100
Absorbancia a 600 nm	0,997	0,135	0,011	0,830	0,097	0,027
Diámetro del halo ± S	15,2±0,5	15,5±0,6	15,2±0,5	13,0±0	14,5±0,6	15,5±0,6

Tabla II. Efecto del inóculo bacteriano sobre el diámetro del halo de inhibición.

Aunque se encontró un pequeño efecto de la dilución del inóculo en el caso de la estirpe AU02I, los resultados muestran claramente que no cabe esperar influencia significativa de la densidad de bacterias empleadas en el inóculo dentro del rango de absorbancias empleadas en ulteriores experimentos, de 0,8 a 1,1 unidades.

3.3 Efecto del Cobre.

A concentraciones iguales o superiores a 25 mM de Cu^{2+} se encontraron dos tipos de halo de inhibición: en uno, la inhibición del crecimiento fue total dentro del halo, que presentaba un borde nítido, mientras que en el segundo se observaron dos halos concéntricos: uno interior, difuso, con un crecimiento menor que en el resto de la placa, y uno exterior con borde nítido. Este resultado se puede interpretar suponiendo que existe un rango de concentraciones de Cu^{2+} que inhibe parcialmente el crecimiento de las bacterias. En el primer grupo se encuadraron las estirpes BTA-7, USDA 110, IB4 y SEMIA 5080, que originaron un único halo nítido, mientras que en las restantes estirpes se encontró el segundo tipo de halo de inhibición. La presencia o ausencia del halo secundario fue un carácter estrictamente reproducible entre diferentes ensayos. Las estirpes IB3 y LS71 resultaron sensibles al Cu^{2+}, presentando un halo secundario muy marcado. IB4 fue sensible al Cu^{2+}, pero no presentó halo, y USDA110 fue resistente. BTA-1 presentó un comportamiento intermedio: si bien la inhibición total por el cobre fue comparable a la encontrada con la estirpe más resistente, presentó un halo secundario de inhibición claramente definido. Las restantes estirpes presentaron rangos de sensibilidad intermedia entre los anteriores.

	mM Cu^{2+}							
	10		25		50		100	
	I	E	I	E	I	E	I	E
IB3	7	---	20	28	24	50	30	55
LS71	7	---	15	24	22	42	22	50
BTA-1	8	---	10	20	12	34	14	41
IB4	9	---	11	---	22	---	30	---
AU02C	9	---	10	13	12	22	15	23
AU02I	6	---	9	---	11	*	14	21
USDA 110	7	---	9	---	10	---	11	---

*Presenta esporádicamente un halo externo de inhibición

Tabla III. Efecto del cobre sobre el crecimiento de 7 estirpes. Se muestran los resultados de un experimento representativo. I: halo interno. E: halo externo.

3.4 Resistencia a mercurio.

Todas las estirpes, con la excepción de AU02I, se comportaron de igual modo, presentando halos de inhibición en presencia de mercurio que dependieron de la concentración como se muestra en la tabla IV. La estirpe AU02I resultó ser muy resistente al Hg^{2+} en las condiciones de ensayo. Los halos de inhibición fueron siempre claramente definidos, con borde nítido y sin trazas de crecimiento en su interior.

	mM Hg^{2+}			
	0,01	0,1	1,0	10
AU02I	No hay halo	6 ± 0,6	7 ± 0,8	13,7 ± 0,8
Resto de las estirpes *	7,1 ± 0,7	8,6 ± 1,0	15,9 ± 1,2	31,6 ± 3,6

* Se presenta la media ± desviación estándar de los halos de inhibición de todas las estirpes. En todos los casos el diámetro del halo se encontró en el rango comprendido por la media ± 1,5 S.

Tabla IV. Diámetro en mm del halo de inhibición producido por diferentes concentraciones de Hg^{2+}.

3.5 Interacción entre el cobre y el mercurio.

Cuando se aplicaron en la misma placa de cultivo las disoluciones a ensayar de Cu^{2+} y de Hg^{2+} se observó en algunos casos que el halo de inhibición producido por el Cu^{2+} era mayor que el encontrado en placas en las que no estaba presente Hg^{2+}. Es decir, que la presencia de mercurio incrementaba el efecto tóxico del cobre, aunque ambos metales se encontraban aplicados en puntos diferentes y suficientemente separados para que no hubiese contacto entre los halos de inhibición que ambos producían. Este resultado se obtuvo también en ensayos en los que se separó físicamente mediante corte la zona de la placa en la cual se depositaba el mercurio de aquella en la cual se depositaba el cobre, por lo que cabe deducir que este fenómeno no se debía a la difusión a través del agar. Este fenómeno lo presentaron las estirpes BGA-1, BTA-8, BCO-4, USDA 110 y AU02C, y no lo presentaron las estirpes BTA-7, AU02I y AU03.

	100 mM Cu^{2+}	100 mM Cu^{2+}, 10 mM Hg^{2+}
AU02I	15,3 ± 0,5	14,1 ± 0,9
AU03	21,0 ± 0,8	20,7 ± 0,5
BGA-1	16,0 ± 0,8	24,7 ± 1,2
BCO-4	19,7 ± 0,9	30,7 ± 1,5

Tabla V. Halo de inhibición producido por 100 mM Cu^{2+} en presencia o ausencia de una aplicación de 10 Mg Hg^{2+} en la misma placa. Los experimentos se realizaron por triplicado, y se presentan las medias ± desviación estándar del diámetro del halo interno.

El incremento de la toxicidad aparente del cobre producida por el mercurio se encontró también entre diferentes estirpes empleando el método de la placa partida. Para ello se sembró en media placa una estirpe y en la otra media una diferente, aplicándose Cu^{2+} o Hg^{2+}

en cada mitad, según procediera. Los resultados de un experimento se muestran en la Tabla VI. En resumen, en presencia de Hg^{2+} tanto BCO-4 (tabla V) como AU02I producen un compuesto volátil que incrementa la toxicidad del Cu^{2+} para la estirpe BCO4, pero que no afecta a la toxicidad del Cu^{2+} para la estirpe AU02I.

Estirpe en presencia de 10 mM Hg^{2+}	Estirpe en presencia de Cu^{2+}	mM Cu^{2+}		
		25	50	100
ninguna	BCO-4	10,3 ± 0,5	12 ± 0,8	18,7 ± 3,1
AU02I	BCO4	19,5 ± 3,0	23,2 ± 4,3	28,7 ± 4,1
ninguna	AU02I	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,8	14,5 ± 0,4
AU02I	AU02I	9,5 ± 0,8	10,2 ± 1,4	13,3 ± 0,9

Tabla VI. Diámetro medio de los halos internos de inhibición producidos por diferentes concentraciones de Cu^{2+} en presencia o ausencia de la estirpe AU021 cultivada en presencia de Hg^{2+} en la misma placa.

3.6 Efectos del cadmio, plomo y aluminio.

Las estirpes estudiadas se agruparon en tres grupos claramente definidos en lo que se refiere a su sensibilidad al cadmio, como se muestra seguidamente.

		mM Cd^{2+}	
Categoría	Estirpes	10	100
Sensibles	BTA-1; BTA-8	15,0 ± 0,3	32,3 ± 2,0
	IB4	27 ± 0,4	
Moderadamente sensibles	BGA-1; BCO-4; AU03; E109; E110	13,2 ± 1,1	24,5 ± 0,9
Resistentes	BTA-7; IB3; AU02I; AU02C; USDA 110; SEMIA 5080; LS71	7,2 ± 1,1	16,0 ± 0,6

Tabla VII. Diámetro en mm del halo de inhibición producido por diferentes concentraciones de Cd^{2+}.

Destaca el comportamiento de la estirpe *B. (Lotus)* IB4. No sólo 10 mM Cd^{2+} produjo un halo de inhibición significativamente mayor que en las restantes estirpes, sino que fue la única en la que la concentración de 1 mM produjo un claro halo de inhibición (11 mm). En ningún caso se encontró halo de inhibición cuando la concentración de cadmio fue de 0,1 mM.

Como se ha expuesto en el apartado 3.1, el Pb^{2+} en todos los casos originó halos de inhibición muy pequeños cuando se empleó a concentración 100 mM. No se produjo halo de inhibición a concentraciones de 10 mM o inferiores. Todas las bacterias estudiadas se comportaron igual, no encontrándose ninguna estirpe ni especialmente sensible ni resistente.

Aunque el Al^{3+} no es considerado generalmente como un metal tóxico de importancia ambiental, estudiamos su efecto sobre los bradirizobios porque la estirpe BGA-1 produce un exopolisacárido ácido capaz de formar un precipitado con Al^{3+} [1], mientras que el exopolisacárido producido por otras estirpes no presenta este fenómeno. Teniendo en cuenta que este precipitado exopolisacárido-metal podría constituir un mecanismo de defensa de la bacteria frente a concentraciones tóxicas del aluminio, parecía interesante determinar si existían diferencias de sensibilidad al aluminio entre las diferentes estirpes, y si estas diferencias estaban relacionadas con el tipo de polisacárido producido por cada una. Para ello se usaron exclusivamente las estirpes de las que es conocida la estructura de su polisacárido. En ningún caso el Al^{3+} a una concentración 10 mM o inferior produjo halo de inhibición. A una concentración de 100 mM se produjeron halos de inhibición nítidos, pero no se encontró ninguna relación entre la naturaleza del polisacárido y el diámetro del halo de inhibición.

	BTA-1	BGA-1	BTA-7	BTA-8	BCO-4	USDA 110
Tipo de polisacárido	Neutro	ácido	ácido	ácido	neutro	ácido
Precipitación con Al^{3+}	No	si	no	no	no	no
Diámetro	10,3 ± 0,5	11,8 ± 0,4	10,0*	7,3 ± 0,5	14,4 ± 0,9	7,1 ± 0,6

* El triplicado originó el mismo valor.

Tabla VIII. Diámetro del halo de inhibición (en mm) producido por 100 mM Al^{3+}.

4 DISCUSIÓN

Aunque el método de difusión en agar empleado en este trabajo no es preciso para determinar las concentraciones inhibitorias de los diferentes cationes metálicos, sí que resulta útil para determinar la sensibilidad relativa de las diferentes estirpes estudiadas. En este sentido cabe señalar que la resistencia a metales no está relacionada ni con el origen geográfico ni con la planta hospedadora de la que se aislaron las estirpes. Así, la estirpe AU02I, aislada en las inmediaciones de las minas de pirita de Río Tinto, resultó ser la más resistente a mercurio, y aparece en el grupo de las más resistentes a cadmio y cobre, al igual que AU02C; esto cabría esperarlo teniendo en cuenta su origen. Sin embargo, la estirpe aislada de la misma localidad AU03 no fue especialmente resistente a estos metales. Tampoco se ha encontrado una correlación general en la resistencia a diferentes metales: por ejemplo, las estirpes IB3 y LS71 resultaron resistentes al cadmio pero muy sensibles al cobre. Por su parte la estirpe USDA 110 de *B. japonicum*, de uso generalizado como inoculante de soja, mostró una elevada resistencia a cobre y cadmio.

Por otro lado, este método ha permitido demostrar la existencia del incremento de la sensibilidad al Cu^{2+} en presencia de Hg^{2+}. Este fenómeno reviste un notable interés, ya que en nuestro conocimiento no había sido descrito anteriormente y plantea cuestiones de importancia en cuanto al estudio de la toxicidad de metales pesados. En resumen, el fenómeno considerado tiene las siguientes características: 1) No requiere el contacto directo entre el Cu^{2+} y el Hg^{2+} , lo que implica la transmisión de un compuesto volátil. 2) Es específico para determinadas estirpes. La presunta volatilidad del compuesto activo se puede explicar fácilmente, teniendo en cuenta que uno de los procesos de eliminación de mercurio consiste en

su metilación a metil-mercurio, así mismo tóxico pero volátil. Obviamente se requiere trabajo posterior para confirmar esta hipótesis, pero de ser cierta supondría que el efecto tóxico de los metales no debe ser estudiado aisladamente, dado que se pueden producir efectos de tipo sinérgico que requieran protocolos de estudio adecuados.

5 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos 1997/010 y PI2000/081 del Gobierno de Canarias. J.H.H es poseedor de una Beca CajaCanarias-ULL. W.D. disfrutó una ayuda del Programa VIII de la UNICEN (Argentina).

6 BIBLIOGRAFÍA

[1] CORZO, J., LEÓN-BARRIOS, M., HERNANDO-RICO, V. y GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60, 4531-4536.

[2] GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M., LEÓN-BARRIOS, M. y CORZO, J. (1993) Rev. Acad. Canar. Ciencias V (4), 59-115.

[3] HASSEN, A., SAIDI, N., CHERIF, M. y BOUDABOUS, A. (1998) Bioresource Technology 64, 7-15.

[4] IRRISARRI, P., MILNITSKY, F., MONZA, J. y BEDMAR, E. J. (1996) Plant Soil 180, 39-74.

[5] LEDIN, M. (2000) Earth-Sci. Rev. 51, 1-31.

[6] PURCHASE, D., MILES, R. J. y YOUNG T. W. K. (1997) FEMS Microbiol. Ecol. 22, 85-93.

[7] SANTAMARÍA, M., AGIUS, F., MONZA, J., GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M. y CORZO, J. (1999) FEMS Microbiol. Ecol. 28, 163-168.

[8] SANTAMARÍA, M., CORZO, J., LEÓN-BARRIOS, M. y GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M. (1997), Plant Soil 190, 143-152.

[9] SANTAMARÍA, M., GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M. y CORZO, J. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 64, 902-906.

[10] SANTOS, M. A., VARGAS, M. A. T. y HUNGRÍA, M. (1999) FEMS Microbiol. Ecol. 30, 261-272.

[11] SMITH., S. R. y GILLER, K. E. (1992) Soil Biol. Biochem. 24, 781-788.

[12] VINCENT, J. M. (1970), en: *A manual for the Practical study of the Root Nodule Bacteria,* Blackwell Sci. Pub., Oxford.